Медицинская иммунология
2019, Т. 21, № 1, стр. 137-140
© 2019, СПб РО РААКИ

Краткие сообщения
Short communications

Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya
2019, Vol. 21, № 1, pp. 137-140
© 2019, SPb RAACI

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ АПОПТОЗА В УСЛОВИЯХ ЭКСПОЗИЦИИ СТАБИЛЬНЫМ СТРОНЦИЕМ

Долгих О.В., Зайцева Н.В., Дианова Д.Г., Кривцов А.В., Старкова К.Г., Отавина Е.А.

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Резюме. Высокорегулируемую форму запрограммированной смерти клетки с характерными морфологическими и биохимическими признаками определяют как апоптоз. Разнообразные факторы, в том числе и металлы, способны оказывать воздействие на интенсивность протекания реакции запрограммированной клеточной гибели. Цель работы – моделирование в системе *in vitro* апоптоза в условиях экспозиции стабильным стронцием. Обследовали детское население, потребляющее питьевую воду с повышенным содержанием стронция (Sr^{2+}) (n = 49). Уровень апоптоза лимфоцитов определяли на проточном цитометре с помощью окрашивания аннексином V, конъюгированным с FITC (AnnV-FITC), и пропидиум йодидом (PI), определяли AnnV-FITC$^+$PI$^-$ – ранний апоптоз, AnnV-FITC$^+$PI$^+$ – поздний апоптоз и некроз. Лейкоциты, выделенные у обследуемого контингента, инкубировали со Sr^{2+} в концентрации 7,0 мг/дм^3 (концентрация, соответствующая ПДК для воды водных объектов) в течение 4 часов при 37 °С. Экспрессию маркеров апоптоза CD95 и p53 проводили методом проточной цитометрии с использованием меченых моноклональных антител. Экспозиция стронцием *in vitro* характеризовалась достоверным снижением уровня экспрессии регуляторных факторов апоптоза мембранного маркера CD95 и внутриклеточного транскрипционного белка p53 в 1,56 раза и в 1,68 раза соответственно. Одновременно отмечено достоверное уменьшение в 4,68 раза количества AnnV-FITC$^+$PI$^-$ клеток, а также статистически значимое повышение в 1,35 раза процентного содержания AnnV-FITC$^+$PI$^+$ клеток. Кроме того, во всех пробах количество AnnV-FITC$^+$PI$^-$ лимфоцитов было ниже физиологической нормы и контрольных значений, а количество проб, где содержание AnnV-FITC$^+$PI$^+$ лимфоцитов превышало установленные нормативы и контрольные значения, составляло 30,8%. Таким образом, экспериментально доказано, что стронций в концентрации, соответствующей ПДК для водных объектов, с высокой степенью достоверности ингибирует гибель клетки по пути апоптоза с переключением на реализацию клеточной гибели путем некроза по критерию содержания фосфатидилсерина, выявляемого в тесте с аннексином V. Полученные данные выявили способность стронция оказывать существенное воздействие на показатели регуляции и поддержания клеточного гомеостаза, влияя на интенсивность протекания процесса апоптоза смещением баланса в сторону реализации клеточной гибели путем некроза и снижая экспрессию регуляторных факторов. Результаты исследования могут использоваться для идентификации и обоснования маркерных показателей нарушений иммунного ответа при оценке внешнесредового воздействия стронция на здоровье населения в условиях специфического факторного окружения.

Ключевые слова: иммунный статус, клеточный маркер, апоптоз, стабильный стронций, экспериментальное моделирование, проточная цитометрия

Адрес для переписки:

Долгих Олег Владимирович
ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»
614045, Россия, г. Пермь, ул. Монастырская, 82.
Тел.: 8 (342) 236-39-30.
Факс: 8 (342) 237-25-34.
E-mail: oleg@fcrisk.ru

Address for correspondence:

Dolgikh Oleg Vladimirovich
Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies
614045, Russian Federation, Perm, Monastyrskaya str., 82.
Phone: 7 (342) 236-39-30.
Fax: 7 (342) 237-25-34.
E-mail: oleg@fcrisk.ru

Образец цитирования:

О.В. Долгих, Н.В. Зайцева, Д.Г. Дианова, А.В. Кривцов, К.Г. Старкова, Е.А. Отавина «Экспериментальное моделирование апоптоза в условиях экспозиции стабильным стронцием» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 137-140.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-137-140

© Долгих О.В. и соавт., 2019

For citation:

O.V. Dolgikh, N.V. Zaitseva, D.G. Dianova, A.V. Krivtsov, K.D. Starkova, E.A. Otavina "Experimental modeling of apoptosis under conditions of stable strontium exposure", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 137-140.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-137-140

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-137-140

EXPERIMENTAL MODELING OF APOPTOSIS UNDER CONDITIONS OF STABLE STRONTIUM EXPOSURE

Dolgikh O.V., Zaitseva N.V., Dianova D.G., Krivtsov A.V., Starkova K.D., Otavina E.A.

Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Abstract. Apoptosis is defined as a highly regulated form of programmed cell death with typical morphological and biochemical features. A variety of factors, including heavy metals, may influence the intensity of programmed cell death. The aim of the work was to simulate apoptosis in an *in vitro* system under the conditions of stable strontium exposure. The children's population consuming drinking water with high strontium (Sr^{2+}) content (n = 49) was observed. The level of lymphocyte apoptosis was determined with flow cytometry technique, by means of labeled annexin V-FITC conjugate (AnnV-FITC) and propidium iodide (PI) staining. AnnV-FITC$^+$PI$^-$ cells were regarded as early apoptotic forms, whereas late apoptotic and/or necrotic cells were AnnV-FITC$^+$PI$^+$. The isolated leukocytes were incubated with Sr^{2+} at a concentration of 7.0 mg/l, the maximal permitted concentration (MPC) for water of aqueous objects, for 4 hours at 37 °C. Expression of CD95 and p53 apoptosis markers was performed by flow cytometry using labeled monoclonal antibodies. *In vitro* exposure to strontium was associated with significantly decreased expression of apoptosis-regulating factors, i.e., membrane marker CD95 and intracellular transcription protein p53, 1.56- and 1.68-fold, respectively. Meanwhile, we revealed a significantly (4.68-fold) decreased amounts of AnnV-FITC$^+$PI$^-$ -cells, as well as a statistically significant (1.35-fold) increase of the AnnV-FITC$^+$PI$^+$ -cells. Moreover, the amounts of AnnV-FITC$^+$PI$^-$ -lymphocytes in all samples were below the physiological ranges and control values. The number of samples with higher contents of AnnV-FITC$^+$PI$^+$ -lymphocyte exceeding the established standards and control values, was 30.8%. Thus, it has been experimentally proven that strontium, at a concentration corresponding to MPC for water objects may significantly inhibit cell death along apoptotic pathways, with switching to necrotic cell death mechanisms, according to phosphatidylserine contents, as detected by annexin V binding test. The data have revealed an ability of strontium to have a significant effect upon the parameters of regulation and maintenance of cellular homeostasis, by influencing the apoptosis intensity, due to shifting a balance towards necrosis and reducing expression of apoptosis-regulating factors. The results of this study may be used in order to identify some marker indexes of immune disorders potentially induced by external influence of strontium upon human health under specific environmental factors.

Keywords: immune status, cell markers, apoptosis, stable strontium, experimental modeling, flow cytometry

Неблагоприятное влияние факторов окружающей среды на здоровье населения определяется в том числе и функциональными сдвигами в системе иммунной резистентности организма, играющей ключевую роль в реализации стратегии адаптации к постоянно меняющимся факторам внутренней и внешней среды [2, 5]. Изменения иммунных реакций загрязнителями окружающей среды могут приводить к повышению риска развития ряда заболеваний, причинами которых часто являются нарушения, связанные с генетически детерминированной клеточной гибелью [6, 7, 8].

Высокорегулируемую форму запрограммированной смерти клетки с характерными морфологическими и биохимическими признаками определяют как апоптоз [3]. Разнообразные факторы способны индуцировать апоптоз или препятствовать ему. Металлы, в том числе и стронций, также могут оказывать воздействие на интенсивность протекания реакции запрограммированной клеточной гибели [1, 4, 9], поэтому исследование особенностей запуска, изменения и регуляции процесса апоптоза в условиях химической трансформации среды обитания представляется актуальной задачей.

Цель работы – моделирование в системе *in vitro* апоптоза в условиях экспозиции стабильным стронцием.

Обследовали детское население, потребляющее питьевую воду с повышенным содержанием стронция (Sr^{2+}) (n = 49). Детекцию апоптоза проводили на проточном цитометре FACSCalibur фирмы Becton Dickinson (BD, США). Уровень апоптоза лимфоцитов определяли с помощью окрашивания аннексином V, конъюгированным с FITC (AnnV-FITC), и пропидиум йодидом (PI) согласно протоколу фирмы-производителя (BD, США). Определяли AnnV-FITC$^+$PI$^-$ – ранний апоптоз, AnnV-FITC$^+$PI$^+$ – поздний апоптоз и некроз. Для изучения влияния Sr^{2+} на включение клеток в апоптоз суспензию лейкоцитов, выделенных у обследуемого контингента, инкубировали со Sr^{2+} в концентрации 7,0 мг/дм^3 (концентрация, соответствующая ПДК для воды водных объектов) в течение 4 часов при 37 °С (опытная проба). После инкубации 100 мкл клеточной суспензии переносили в пробирки и подвергали

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ АПОПТОЗА ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ОБСЛЕДОВАННЫХ ДЕТЕЙ С УЧЕТОМ КОНТАМИНАНТНОЙ НАГРУЗКИ СТРОНЦИЕМ, n = 49, Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF BLOOD LEUKOCYTE APOPTOSIS INDICATORS OF CHILDREN, TESTED WITH THE CONTAMINANT LOAD BY STRONTIUM, n = 49, Me ($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)

Показатель Index	**Проба без добавления стронция Sr^{2+} (контроль)** Sample without addition of strontium Sr^{2+} (control)	**Проба с добавлением стронция Sr^{2+} (опыт)** Sample with the addition of strontium Sr^{2+} (experience)	**p**
CD95 %	12,5 (11,0-14,0)	8,0 (7,10-11,0)	0,001
p53, %	0,42 (0,40-0,62)	0,25 (0,15-0,40)	0,00001
Annexin V-$FITC^+PI^-$, %	0,89 (0,60-1,19)	0,19 (0,18, 0,35)	0,00003
Annexin V-$FITC^+PI^+$, %	9,16 (8,47-10,98)	12,33 (10,42-15,01)	0,02092

Примечание. p – различие между контрольной и опытной пробой по U-критерию Манна–Уитни.

Note. p, the difference between the control and experimental sample according to the Mann–Whitney U-test.

стандартной процедуре окрашивания с помощью аннексина V и PI. Раствор стронция готовили из «Государственного стандартного образца состава раствора ионов стронция» ГСО 7145-95 (ООО «Эколан», Россия). В качестве контроля использовали лейкоцитарные клетки без добавления Sr^{2+}, которые инкубировали при таких же условиях. Исследование экспрессии маркеров апоптоза CD95 и p53 проводили методом проточной цитометрии с использованием меченых моноклональных антител согласно протоколу фирмы-производителя (BD, США).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для оценки значимости межгрупповых различий в случае отклонения от нормального распределения использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Результаты представлены в виде медианы (Me) и процентилей ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$). Во всех процедурах статистического анализа рассчитывался достигнутый уровень значимости (p), при этом уровень значимости принимался равным 0,05.

Для изучения воздействия стронция в эксперименте *in vitro* получали образцы крови у детского населения, постоянно проживающего в условиях повышенного содержания металла в воде хозяйственно-бытового водоснабжения (стронциевая геохимическая провинция). Экспериментально доказано, что стронций в концентрации 7 мг/дм^3, соответствующей ПДК для водных объектов, с высокой степенью достоверности ($p < 0,05$) ингибирует гибель клетки по пути апоптоза с переключением на реализацию клеточной гибели путем некроза по критерию содержания фосфатидилсерина, выявляемого в тесте с аннексином V (табл. 1).

Экспозиция стронцием *in vitro* характеризовалась статистически значимым снижением уровня экспрессии регуляторных факторов апоптоза мембранного маркера CD95 и внутриклеточного транскрипционного белка p53 в 1,56 раза и в 1,68 раза соответственно ($p < 0,05$). Одновременно отмечено достоверное уменьшение в 4,68 раза количества AnnV-$FITC^+PI^-$ клеток, а также статистически значимое повышение в 1,35 раза процентного содержания AnnV-$FITC^+PI^+$ клеток ($p < 0,05$). Кроме того, установлено, что во всех пробах количество AnnV-$FITC^+PI^-$ лимфоцитов было ниже физиологической нормы (1,5-2,5%) и контрольных значений, а количество проб, где содержание AnnV-$FITC^+PI^+$ лимфоцитов превышало установленные нормативы (7,0-11,0%) и контрольные значения, составляло 30,8%. Следует отметить, что во всех анализируемых пробах после внесения стронция в суспензию лейкоцитов отмечалось повышение содержания AnnV-$FITC^+PI^+$ клеток на 10-50% от исходного уровня.

Таким образом, проведенное исследование особенностей регуляции процесса апоптоза у детского населения, экспонированного стронцием, в условиях экспериментального воздействия металлом *in vitro* показало:

1) снижение экспрессии мембранных и внутриклеточных регуляторных маркеров апоптоза (CD95, p53);

2) уменьшение количества вступающих в апоптоз AnnV-$FITC^+PI^-$ клеток и возрастание AnnV-$FITC^+PI^+$ лимфоцитов с проявлением признаков некроза.

Полученные данные выявили способность стронция оказывать существенное воздействие на показатели регуляции и поддержания клеточного гомеостаза, влияя на интенсивность протекания процесса апоптоза смещением баланса в сторону реализации клеточной гибели путем некроза и снижая экспрессию регуляторных факторов. Экспериментально установлено, что стабильный стронций в концентрации, соответствующей предельно допустимой для водных объектов, ингибирует гибель клетки по пути апоптоза. Результаты исследования могут использоваться для идентификации и обоснования маркерных показателей нарушений иммунного ответа при оценке внешнесредового воздействия стронция на здоровье населения в условиях специфического факторного окружения.

Список литературы / References

1. Дианова Д.Г., Вдовина Н.А., Пирогова Е.А., Рочев В.П. Количественная оценка биомаркеров апоптоза и клеточной регуляции у детей с повышенным содержанием стронция в организме // Российский иммунологический журнал, 2015. Т. 9 (18), № 2 (1). С. 129-131. [Dianova D.G., Vdovina N.A., Pirogova E.A., Rochev V.P. Quantitative evaluation of biomarkers of the apoptosis and cell regulation in children having high concentration of strontium in a body. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology, 2015, Vol. 9 (18), no. 2 (1), pp. 129-131.* (In Russ.)]

2. Зайцева Н.В., Долгих О.В., Дианова Д.Г. Особенности иммунологических и генетических нарушений человека в условиях дестабилизации среды обитания. Пермь: Издательство Пермского национального исследовательского политехнического университета, 2016. 300 с. [Zaytseva N.V., Dolgikh O.V., Dianova D.G. Immunological and genetic features of human disorders in conditions of environmental destabilization]. Perm: Publishing House of the Perm National Research Polytechnic University, 2016. 300 p.

3. Agostini M., Tucci P., Melino G. Cell death pathology: perspective for human diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun., 2011, Vol. 414, no. 3, pp. 451-455.*

4. Aimaiti A., Maimaitiyiming A., Boyong X., Aji K., Li C., Cui L. Low-dose strontium stimulates osteogenesis but high-dose doses cause apoptosis in human adipose-derived stem cells via regulation of the ERK1/2 signaling pathway. *Stem Cell Res. Ther., 2017, Vol. 8, no. 1, p. 282.*

5. Duramad P., Holland N.T. Biomarkers of immunotoxicity for environmental and public health research. *Int. J. Environ. Res. Public Health, 2011, Vol. 8, no. 5, pp. 1388-1401.*

6. Favaloro B., Allocati N., Graziano V., di Ilio C., de Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY), 2012, Vol. 4, no. 5, pp. 330-349.*

7. Li K., Wu D., Chen X., Zhang T., Zhang L., Yi Y., Miao Z., Jin N., Bi X., Wang H., Xu J., Wang D. Current and emerging biomarkers of cell death in human disease. *Biomed. Res. Int., 2014, Vol. 2014, 690103.* doi: 10.1155/2014/690103.

8. Nagata S., Tanaka M. Programmed cell death and the immune system. *Nat. Rev. Immunol., 2017, Vol. 17, no. 5, pp. 333-340.*

9. Pilmane M., Salma-Ancane K., Loca D., Locs J., Berzina-Cimdina L. Strontium and strontium ranelate: Historical review of some of their functions. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl., 2017, Vol. 78, pp. 1222-1230.*

Авторы:

Долгих О.В. *— д.м.н., профессор, заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия*

Зайцева Н.В. *— д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия*

Дианова Д.Г. *— к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия*

Кривцов А.В. *— к.м.н., заведующий лабораторией иммуногенетики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия*

Старкова К.Г. *— к.б.н., заведующая лабораторией иммунологии и аллергологии ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия*

Отавина Е.А. *— младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и аллергологии ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия*

Authors:

Dolgikh O.V., *PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunobiological Diagnostic Methods, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation*

Zaitseva N.V., *PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Research Director, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation*

Dianova D.G., *PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Diagnostics, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation*

Krivtsov A.V., *PhD (Medicine), Head, Laboratory of Immunogenetics, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation*

Starkova K.G., *PhD (Biology), Head, Laboratory of Immunology and Allergology, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation*

Otavina E.A., *Junior Research Associate, Laboratory of Immunology and Allergology, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation*

Поступила 28.03.2018
Отправлена на доработку 05.04.2018
Принята к печати 18.04.2018

Received 28.03.2018
Revision received 05.04.2018
Accepted 18.04.2018